



#4



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 196 44 500.0

Anmeldetag: 25. Oktober 1996

Anmelder/Inhaber: Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts, Heidel-
berg, Neckar/DE; Transgene S.A.,
Straßburg/Strasbourg/FR.

Erstanmelder: Deutsches Krebsforschungs-
zentrum Stiftung des öffentlichen Rechts,
Heidelberg, Neckar/DE

Bezeichnung: AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen

IPC: C 12 N, A 61 K, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 01. Februar 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Waasmaier

Anmelder: Deutsches Krebsforschungszentrum
"AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen"
Unser Zeichen: K 2357 - hu / wd

Die vorliegende Erfindung betrifft AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, ein eine solche enthaltendes System und ihre Verwendung.

5 AAVs (Adeno-assoziierte Viren) sind einzelsträngige, zur Familie der Parvoviren gehörende DNA-Viren. Für ihre Replikation, d.h. zur Ausbildung von Viruspartikeln, benötigen AAVs Helferviren, insbesondere Adenoviren oder Herpesviren. In Abwesenheit von Helferviren können AAVs in das Wirtszellgenom, insbesondere an einer spezifischen Stelle von Chromosom 19, integrieren.

10 Das Genom von AAVs ist linear und weist eine Länge von ca. 4680 Nukleotiden auf. Es umfaßt zwei Leserahmen, die für ein strukturelles und ein nicht-strukturelles Gen kodieren. Das strukturelle Gen wird mit cap-Gen bezeichnet. Dieses steht unter der Kontrolle des P40-Promotors und kodiert für drei Capsid-Proteine. Das nicht-strukturelle Gen wird mit rep-Gen bezeichnet und kodiert für die Rep-Proteine, Rep 78, Rep 68, Rep 52 und Rep 40. Die beiden ersteren werden unter der Kontrolle des P5 Promotors exprimiert, während die Expression von Rep 52 und Rep 40 unter der Kontrolle des P19 Promotors steht. Die Funktionen der Rep-Proteine liegen u.a. in der Regulation der Replikation und Transkription des AAV-Genoms.

20 Es hat sich nun gezeigt, daß Präparationen von rekombinanten (r)AAV-Viruspartikeln häufig mit Helferviren, z.B. Adenoviren oder Herpesviren, kontaminiert sind. Diese Kontamination stellt eine erhebliche Limitierung der Verwendung von rAAV-Viruspartikeln für die Gentherapie dar. Bemühungen, die Helferviren durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation oder Filtrationsverfahren zu entfernen, waren bisher wenig erfolgreich, insbesondere umfassen diese Verfahren Schritte, die sich bei den Kosten und in der Ausbeute nachteilig bemerkbar machen.

30 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem rAAV-Viruspartikel ohne Kontamination mit Helferviren bereitge-

stellt werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit eine AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, die für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind.

10

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß durch eine erfindungsgemäße AAV-DNA ein in Zellen gemeinsam vorliegender, eine Fremd-DNA enthaltender rAAV-Vektor zur Ausbildung von rAAV-Viruspartikeln veranlaßt wird, ohne daß hierfür Helferviren zugegeben werden müssen.

15

Der Ausdruck "AAV-DNA" umfaßt jegliche AAV-DNA, die Helfervirus-Sequenzen enthalten kann, welche für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind.

20

Der Ausdruck "Helfervirus-Sequenzen" betrifft jegliche Sequenzen eines Helfervirus, die zur Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind. Solche Sequenzen stammen insbesondere von Herpes- und/oder Adenoviren, ganz besonders von Adenovirus 5. Die Sequenzen können das gesamte Virus-Genom oder Fragmente davon umfassen.

25

Der Ausdruck "rAAV-Vektor" umfaßt jegliches AAV-Viruspartikel und dessen DNA, die eine Fremd-DNA, außer einer solchen eines Helfervirus, enthalten können, welche für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig ist.

30

Der Ausdruck "Fremd-DNA" betrifft mit vorstehender Ausnahme jegliche DNA, die in einem AAV-Vektor integriert sein kann. Die Fremd-DNA kann nicht-kodierend oder kodierend sein. In ersterem Fall kann sie ein Regulator-Element der DNA-Replikation und/oder Transkription sein. In letzterem Fall ist es günstig, wenn die Fremd-DNA exprimierbar ist, wobei es besonders vorteilhaft ist, wenn

die Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wie eines gewebespezifischen Promotors, steht. Ferner kann die Fremd-DNA für ein diagnostisches und/oder therapeutisches Protein kodieren. Beispiele eines therapeutischen Proteins sind Tumornekrosefaktor, Plasmaproteine und Rezeptoren. Desweiteren kann die Fremd-DNA an beliebiger Stelle des AAV-Vektors inseriert sein.

Eine erfindungsgemäße AAV-DNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Ergänzend wird auf Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook (Band 1-3), Cold Spring Harbour, New York, (1989) verwiesen. Ferner wird auf die Herstellung der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG 9585 in Beispiel 1 verwiesen. Diese AAV-DNA umfaßt als Helfervirussequenzen die vollständige Adenovirus 5-Sequenz mit Ausnahme der E1-Region. pTG 9585 ist bevorzugt. Sie wurde bei der DSM, Braunschweig, als Plasmid pTG9585 unter der Nummer DSM 11248 am 18. Okt. 1996 hinterlegt. Weiterhin ist eine erfindungsgemäße AAV-DNA bevorzugt, die sich von pTG 9585 darin unterscheidet, daß sie eine Deletion im Strukturgen L1 der Adenovirus 5-Sequenz, insbesondere im Bereich der Nukleotide 16614-18669, aufweist. Diese AAV-DNA wird mit pTG 9585 Δ 16614-18669 bezeichnet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein System aus vorstehenden Elementen, d.h. einer AAV-DNA, einem rAAV-Vektor und gegebenenfalls einer Zelle. Die AAV-DNA und/oder die Zelle stellen hinsichtlich der AAV-Sequenzen des rAAV-Vektors eine Komplementation dar. Der Ausdruck "Zelle" betrifft jegliche Zelle, insbesondere Säugetierzelle, welche die Aufnahme und Vermehrung von AAV erlauben.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, rAAV-Viruspartikel-Präparationen bereitzustellen, ohne daß Helferviren verwendet werden müssen. Die rAAV-Viruspartikel-Präparationen sind somit auch Helfervirus frei. Sie stellen ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

Erfindungsgemäße rAAV-Viruspartikel-Präparationen eignen sich bestens zur Transduktion von Zellen. Günstig kann es sein, wenn die Präparationen vor ihrer Verwendung mit einer DNase behandelt werden, wodurch freie AAV-DNA abgebaut wird. Als Zellen kommen jegliche Zellen in Frage, die im oder isoliert aus einem Körper vorliegen. Mit der vorliegenden Erfindung ist es somit möglich, Maßnahmen für eine ex vivo und in vivo Gentherapie zu ergreifen.

Erläuterung der Zeichnung

10 Fig. 1 zeigt die Klonierungsstrategie zum Erhalt der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG9585

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

15

Beispiel 1 : Herstellung der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG9585

Die Klonierungsstrategie zum Erhalt von pTG9585 ist in Fig. 1 gezeigt. Es wird ein MMTV-LTR-Fragment aus PUC8MMTV (Fasel et al., (1982), EMBO J. 1, S. 3-7) in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pBSSKII(+) (Fa. Stratagene) eingefügt. In dieses Plasmid werden dann mit Hilfe eines synthetischen Oligonukleotidadaptors 4235 bp AAV2-Sequenz aus pAV2 (Gene 23,65-73 (1983)) inseriert (AAV2-Basenpaare 263-4497), welche das vollständige rep- und cap-Gen sowie die AAV2-Promotoren p19 und p40 enthalten. Im resultierenden Plasmid pBMA2 ist somit der AAV2-Promotor p5, der die Expression der Rep78 bzw. Rep68-Proteine steuert, durch den MMTV-Promotor ersetzt. Die komplette Expressionskassette bestehend aus dem MMTV-LTR und dem AAV2 rep- und cap-Gen, wird dann an die Stelle des RSV- β gal-Fragments in den Vektor pAdRSV β gal (J. Clin. Invest. 90, 625-630) eingefügt. Im so entstandenen Plasmid pAMA2 wird das MMTV-AAV2-Fragment beiderseitig von adenoviralen Sequenzen (5': 0-1,0 map units; 3': 9,4-18 map units) flankiert.

30

Mittels homologer Rekombination (Chartier et al., J. Virol. 70, S. 4805-4810 (1996)) wird das MMTV-AAV2-Fragment aus pAMA2 in das Plasmid pTG3602 (vgl. Chartier et al. vorstehend) eingefügt. Das resultierende Plasmid pTG9585 enthält somit die vollständige Adenovirus 5-Sequenz mit Ausnahme der E1-Region, die durch das MMTV-AAV2-Fragment substituiert ist. pTG9585 stellt eine erfindungsgemäße AAV-DNA dar.

Beispiel 2: Herstellung der erfindungsgemäßen AAV-DNA pTG9585 Δ 16614-18669

10

In die in Beispiel 1 hergestellte AAV-DNA pTG9585 wird durch Restriktionsverdau mit RsrII eine Deletion der Nukleotide 10983-18670 (die Zahlen beziehen sich auf die Adenovirus 5-Sequenz) eingeführt. Danach wird ein Subfragment mit den Nukleotiden 10963-16613 wieder in das deletierte DNA-Molekül eingesetzt. Die Deletion umfaßt somit einen Bereich von 2056 bp (Nukleotide 16614-18669) aus dem Strukturgen L1 von Adenovirus 5. Es wird die erfindungsgemäße AAV-DNA pTG9585 Δ 16614-18669 erhalten.

15

20

K 2357

Patentansprüche

- 5
1. AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, die für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind.
 2. AAV-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Helfervirus-Sequenzen von Herpesvirus stammen.
 - 10
 3. AAV-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Helfervirus-Sequenzen von Adenovirus stammen.
 4. AAV-DNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Adenovirus Adenovirus 5 ist.
 - 15
 5. AAV-DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die AAV-DNA unter DSM 11248 am 18. Okt. 1996 hinterlegt worden ist.
 - 20
 6. System, umfassend eine AAV-DNA nach Anspruch 1, einen rAAV-Vektor und gegebenenfalls eine Zelle.
 7. Verwendung der AAV-DNA nach Anspruch 1 und des Systems nach Anspruch 6 zur Herstellung einer rAAV-Viruspartikel-Präparation, die nicht mit Helferviren kontaminiert ist.
 - 25

K 2357

Zusammenfassung

AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen

5

Die vorliegende Erfindung betrifft eine AAV-DNA mit Helfervirus-Sequenzen, die für die Ausbildung von AAV-Viruspartikeln notwendig sind, ein eine solche DNA enthaltendes System sowie die Verwendung beider.

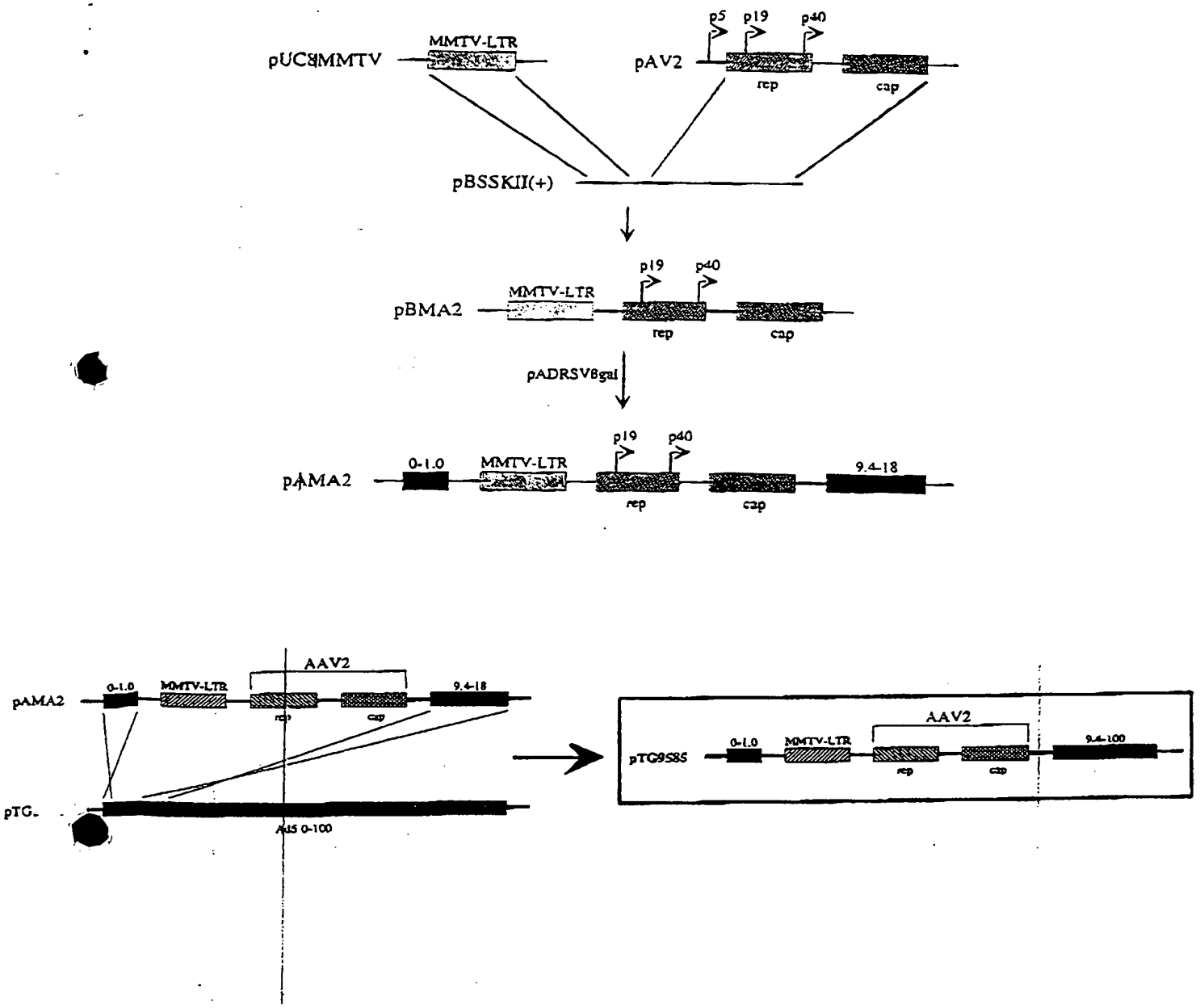


Fig. 1